

Mikroskopowa identyfikacja białek zaangażowanych w naprawę DNA w regionach powtórzeń CAG

Sekwencje powtórzone, występujące bardzo powszechnie w ludzkim genomie, charakteryzują się niestabilnością liczby powtórzeń, która w pewnych przypadkach może być przyczyną chorób genetycznych. Jednym z przykładów są **powtórzenia CAG**, których ekspansja odpowiada za wywołanie wielu **chorób neurodegeneracyjnych**, zwanych chorobami poliglutaminowymi (poliQ), takich jak **choroba Huntingtona** czy ataksje rdzeniowo-mózdkowe. Ilość powtórzeń CAG w przypadku tych chorób jest dodatnio skorelowana z wcześniejszym czasem ujawnienia się choroby oraz ostrością jej przebiegu. Celem nowoczesnych terapii tych chorób jest obniżenie ekspresji chorobotwórczego genu, lub ostatnio próby wycinania ciągu powtórzeń lub jego skracania. Postęp w dziedzinie biologii molekularnej i inżynierii genetycznej pozwolił na precyzyjne edytowanie wybranego fragmentu genomu w celach terapeutycznych. **Technologia CRISPR-Cas9** stanowi obecnie najbardziej wszechstronne narzędzie do edycji genomu, które może być wykorzystane do skracania powtórzeń CAG. W naszych badaniach skróciliśmy ciąg powtórzeń CAG w genie *HTT* indukując dwuniciowe pęknięcie DNA (ang. double-strand breaks, **DSB**) w regionie występowania powtórzeń, przy użyciu nukleazy Cas9. Jedną z hipotez wyjaśniającą powstawanie owych skrótów jest udział ścieżek naprawy DNA wykorzystujących regiony mikrohomologiczne do łączenia końców przeciętego DNA: microhomology-mediated end joining/ alternative end joining (MMEJ/alt-EJ) lub single strand annealing (SSA) angażujące różne białka naprawcze. Hipoteza ta została uprawdopodobniona wynikami naszych ostatnich badań, jednakże do rozstrzygnięcia pozostaje zależność obieranej ścieżki naprawczej od dokładnego miejsca i rodzaju wprowadzonego dwuniciowego pęknięcia DNA. Kolejnym ciekawym zagadnieniem jest skracanie ciągu powtórzeń CAG w efekcie użycia D10A nikazy (Cas9n), która wprowadza jednoniciowe pęknięcie DNA (ang. single-strand break, **SSB**).

Ten projekt ma na celu w sposób bezpośredni, wykorzystując metody mikroskopii, określić który mechanizm jest zaangażowany w naprawę DSB/SSB w regionach powtórzeń CAG i który jest odpowiedzialny za skracanie tego typu ciągów powtórzeń. Odkrycie jakie białka uczestniczą w tym procesie, stworzyłoby możliwości rozwoju przyszłej terapii chorób poliQ.

W projekcie wykorzystana zostanie nowoczesna technologia edycji genomów CRISPR-Cas9 w dwóch aspektach: po pierwsze do indukcji dwuniciowego/jednoniciowego pęknięcia DNA w obrębie ciągu CAG, a także do wizualizacji sekwencji flankujących edytowany region. Do drugiego celu zostanie wykorzystane pozbawione aktywności nukleazowej białko dCas9 oraz system MS2-MCP. Badane białka będą wizualizowane w miejscu naprawy DNA za pomocą metody **immunofluorescencji**, przy użyciu **mikroskopu konfokalnego**. Eksperyment pozwoli na jednoznaczne określenie mechanizmu skracania ciągu CAG w *HTT* po indukcji DSB/SSB.